

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 465**

21 Número de solicitud: 201830905

51 Int. Cl.:

A61K 33/22 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.09.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.03.2020

71 Solicitantes:

**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACION
BIOMEDICA EN RED, M.P. (40.0%)**

**C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11
28029 Madrid ES;**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (35.0%) y

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF GLASGOW (25.0%)**

72 Inventor/es:

RICO TORTOSA, Patricia;

SALMERÓN SÁNCHEZ, Manuel;

ARTERO ALLEPUZ, Rubén;

BARGIELA SCHONBRUNN, Ariadna y

PÉREZ ALONSO, Manuel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de boro y sus derivados para el tratamiento de distrofias musculares.**

57 Resumen:

Uso de boro y sus derivados para el tratamiento de distrofias musculares.

La presente invención se refiere al uso de boro o un compuesto de boro para el tratamiento de distrofias musculares. Los datos experimentales obtenidos in vitro e in vivo por parte de los inventores demuestran que estos compuestos mejoran ciertos fenotipos asociados a la distrofia miotónica de tipo 1 y a la distrofia muscular de Duchenne.

ES 2 749 465 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de boro y sus derivados para el tratamiento de distrofias musculares

5 La invención se refiere al uso de boro o de un compuesto de boro para el tratamiento de distrofias musculares. Por lo tanto, la presente invención puede ser incluida en el campo de la química médica o la farmacología.

ESTADO DEL ARTE

10 El boro es un metaloide esencial que juega un papel clave en los metabolismos de plantas y animales. Se ha visto que el boro se encuentra implicado en la mineralización de huesos, tiene algunos usos en química de síntesis y su potencial ha sido explotado recientemente en química médica. Se conoce poco acerca de la
15 homeostasis y la función del boro en células animales. Se ha reportado que el boro está implicado en la diferenciación miogénica en ratones (*Tissue Eng Part A*. 2015 Nov;21 (21-22):2662-7).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad progresiva y letal,
20 causada por mutaciones asociadas al cromosoma X del gen que codifica la distrofina. La carencia de distrofina conduce a debilidad, degeneración y la consecuente fibrosis en los músculos esquelético y cardíaco. Actualmente, no existe cura para los pacientes de DMD. Las aproximaciones pre-clínicas y clínicas en proyecto incluyen la omisión de exón, la edición genética a través de vectores virales, y los trasplantes de
25 células madre (*Stem Cell Reviews and Reports*, Vol. 14, 2018). Todas estas aproximaciones tardarán un tiempo hasta que se encuentren disponibles, e incluso cuando sean aprobadas podrían solamente resultar adecuadas para una población seleccionada de pacientes y/o tener la capacidad de mejorar los síntomas pero no aliviarlos completamente. Por lo tanto, se necesitan terapias que, ya sea
30 independientemente o en combinación con otras estrategias de tratamiento, mejoren la progresión de la enfermedad.

La distrofia miotónica (DM) es un trastorno neuromuscular predominantemente heredado para la que actualmente no hay cura o tratamiento efectivo. Se han probado diversas
35 aproximaciones terapéuticas, aunque sin un éxito claro (*Drug Discovery Today*. 2017; 22: 1740-1748; *Drug Discovery Today*. 2018; 00: 1-10). Entre ellas, fármacos

conocidos para otras aplicaciones tales como la mexiletina, un anti arrítmico que actúa sobre los canales de sodio, han sido utilizados fuera de las indicaciones previstas (uso “off-label”) para tratar la miotonia en la DM y en miotonias no distróficas. Un estudio preliminar ha sugerido que el IGF1 (rhIGF1) humano recombinante puede mejorar la fuerza y la función muscular en pacientes adultos con DM1, aunque esta terapia presenta importantes limitaciones. Otra aproximación importante para tratar la DM es diseñar oligonucleótidos anti-sentido para neutralizar el ARNm defectuoso en estos pacientes (*Drug Discovery Today*. 2018; 00: 1-10). No obstante, estas aproximaciones al tratamiento de la DM se utilizan a modo de apoyo y no ralentizan ni detienen la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de minimizar el efecto fisiológico del ARNm defectuoso para proporcionar una calidad de vida a los pacientes de esta enfermedad rara.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un tratamiento para las distrofias musculares basado en la administración de boro o un compuesto de boro tal como borato de sodio (bórax). Los inventores presentan resultados experimentales en un modelo de mosca con DM1, donde la ingestión de bórax indujo una mejora en la atrofia muscular y en la capacidad de vuelo, tal como se muestra más adelante. Además, los autores presentan resultados experimentales adicionales obtenidos en células de pacientes con DMD.

Queda claro que existe la necesidad en cuanto al tratamiento de la DM y DMD, y que en la actualidad no se ha obtenido un tratamiento con un éxito aceptable. Los datos experimentales que sustentan los efectos terapéuticos de la presente invención demostrarían que cumple con una necesidad que persiste desde hace tiempo en dicho campo. Como los autores han obtenido resultados positivos similares utilizando bórax en dos distrofias musculares diferentes, con origen etiológico extremadamente diverso, consideran que los efectos terapéuticos del boro son extensibles y abarcan diversas distrofias musculares.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a boro o a un compuesto de boro para uso en el tratamiento de distrofias musculares.

En una realización preferida, dicho compuesto de boro es bórax.

En la presente invención, el término “bórax” se refiere a borato de sodio hidratado $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, que tiene lugar de forma natural como un mineral o se prepara a partir de otros minerales, y habitualmente se presenta en forma de polvo cristalino de color blanco.

Otras formas de boro que pueden incluirse en el alcance de la presente invención pueden ser los siguientes compuestos de boro: piroborato sódico ($\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$), ácido bórico como por ejemplo sal de zinc, ácido perbórico ($\text{HBO}(\text{O}_2)$) como sal de sodio, ácido bórico (H_3BO_3), tetraborato de litio ($\text{B}_4\text{Li}_2\text{O}_7$), pentaborato de amonio ($(\text{NH}_4)\text{B}_5\text{O}_8$), tetraborato de di-plata ($\text{B}_4\text{Ag}_2\text{O}_7$), borato de zinc ($\text{B}_6\text{Zn}_2\text{O}_{11}$), ácido bórico (HBO_2) como sal de litio.

En otra realización preferida, las distrofias musculares se seleccionan de entre distrofia miotónica de tipo 1, distrofia miotónica de tipo 2 o distrofia muscular de Duchenne.

En la presente invención, el término “distrofia muscular” se refiere a un grupo de enfermedades que causan debilidad progresiva y pérdida de masa muscular. En la distrofia muscular, genes anormales (mutaciones) interfieren con la producción de las proteínas necesarias para formar un músculo saludable. El principal signo de la distrofia muscular es la progresiva debilidad muscular. Los signos y síntomas específicos comienzan a edades diferentes y en diferentes grupos de músculos, dependiendo del tipo de distrofia muscular. Son ejemplos de estas enfermedades la distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular miotónica (tipo 1 y tipo 2), distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular de Emery–Dreifuss o distrofia muscular distal. Considerando que estas enfermedades pueden tener un mecanismo fisiológico común, el alcance de la presente invención puede ser aplicable al tratamiento de todo el grupo.

En otra realización preferida, el boro o el compuesto de boro para uso según se ha mencionado, está en combinación con otro principio activo. Como ocurre por ejemplo con bortezomib, un compuesto de boro para la inhibición de la actividad del proteasoma, o en combinación con otras terapias actuales para el tratamiento de enfermedades musculares tales como la inserción de genes y oligonucleótidos, edición

genética, etc., o cualquier otro producto farmacéutico utilizado para el alivio de síntomas de enfermedades musculares.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende boro o un compuesto de boro, para uso en el tratamiento de distrofias musculares.

En una realización preferida, en la composición farmacéutica para uso según se describe, el compuesto de boro es bórax.

10

El boro o compuesto de boro debe estar en una forma farmacéuticamente aceptable para ser parte de la composición de la invención. Tal como se utiliza en la presente patente, "farmacéuticamente aceptable" significa adecuado para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similar, que corresponde a una relación beneficio/riesgo razonable, y efectiva para su uso previsto dentro del alcance de un juicio médico racional.

15

Para el propósito de la presente invención, el boro o compuesto de boro puede estar en forma de solvatos o sales.

20

Tal como se utiliza en la presente patente, "solvato" significa un complejo formado por solvatación (la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del agente activo de la presente invención), o un agregado que consiste en un ion o molécula de un soluto (el agente activo de la presente invención) con una o más moléculas de disolvente. En la presente invención, el solvato preferido es un hidrato. Los ejemplos de hidrato incluyen, pero no se limitan a, hemihidrato, monohidrato, dehidrato, trihidrato, hexahidrato, etc. Debe entenderse por parte de un experto habitual en el arte que la sal farmacéuticamente aceptable del presente compuesto puede también existir en forma de un solvato.

25

30

El término "sales" incluye derivados de un agente activo, en donde el agente activo se modifica realizando sales de adición ácidas o básicas del mismo. Preferiblemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen, pero no se limitan a, sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables, sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Sales de adición ácidas incluyen

35

sales de ácidos inorgánicos además de ácidos orgánicos. Entre los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados se incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similar.

- 5 El boro o el compuesto de boro puede ser administrado con un excipiente, soporte, y vehículo, utilizado comúnmente en el campo de la farmacología. Los vehículos que pueden ser utilizados, pero sin limitarse a, pueden ser materiales poliméricos biodegradables en sus diferentes composiciones (mezcla de co-polímeros: PLLA, PLGA etc.) y formas (películas, partículas, nanopartículas, andamiajes, etc), partículas lipídicas (que abarcan diferentes composiciones lipídicas), hidrogeles, etc.

En otra realización preferida, las distrofias musculares se seleccionan de entre distrofia miotónica de tipo 1, distrofia miotónica de tipo 2 y distrofia muscular de Duchenne.

- 15 En otra realización preferida, la composición farmacéutica para uso según se describe comprende otro principio activo, siendo por tanto una terapia de combinación. El término "terapia de combinación" se refiere a una primera terapia que incluye boro o un compuesto de boro, y/o sus derivados, en conjunción con una segunda terapia (por ejemplo, terapia, cirugía, y/o un agente farmacéutico adicional o un agente biológico tal como un anticuerpo o un oligonucleótido antisentido) útil para tratar, estabilizar, prevenir, y/o retrasar la enfermedad o condición.

- 25 Para estos propósitos, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral, vía parenteral (incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intraesternal o técnicas de infusión), por pulverización para inhalación, o por vía rectal, en formulaciones de dosis unitarias que contienen soportes, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

- 30 Estas composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en forma de suspensiones o comprimidos administrables por vía oral; pulverizadores nasales; preparaciones inyectables estériles, por ejemplo, como suspensiones o supositorios estériles inyectables acuosos u oleaginosos.

- 35 Cuando se administran por vía oral como una suspensión, estas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte de una formulación

farmacéutica y pueden contener celulosa microcristalina para proporcionar volumen, ácido algínico o alginato de sodio como un agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de viscosidad, y agentes endulzantes/saborizantes conocidos en el arte. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener
5 celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa, y/o otros excipientes, aglutinantes, extendedores, desintegrantes, diluyentes y lubricantes conocidos en el arte.

Cuando se administran por aerosol o inhalación nasal, estas composiciones se preparan de acuerdo a técnicas bien conocidas en el arte de la formulación farmacéutica y pueden ser preparadas como soluciones en salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en el arte.

Las soluciones o suspensiones inyectables pueden ser formuladas de acuerdo con el arte conocido, utilizando diluyentes o disolventes no tóxicos adecuados aceptables para administración por vía parenteral, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución de cloruro de sodio isotónico, o agentes de dispersión o
20 humidificantes y de suspensión, tal como aceites estériles, suaves, fijos, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.

Cuando se administran por vía rectal en forma de supositorios, estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante, tal como manteca de cacao, ésteres de glicérido sintético o polietilenglicoles, que son
25 sólidos a temperaturas ordinarias, pero se licúan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Los compuestos de esta invención pueden ser administrados por vía oral a humanos en un rango de dosificación de 1 a 100 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. Un
30 rango de dosificación preferido es 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal por vía oral en dosis divididas. Otro rango de dosificación preferido es de 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal por vía oral en dosis divididas. Para terapia de combinación con análogos de nucleósidos, un rango de dosificación preferido es de 0,01 a 20 mg/kg peso corporal para los compuestos de esta invención administrados por vía oral en dosis divididas, y
35 de 50 mg a 5 g/kg peso corporal para análogos de nucleósidos administrados por vía

oral en dosis divididas. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular puede ser variado y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la condición en particular, y el huésped que está sometido a terapia.

Estas composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones o comprimidos administrables por vía oral; pulverizadores nasales; preparaciones inyectables estériles, por ejemplo, como suspensiones o supositorios acuosos o oleaginosos estériles inyectables.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método de tratamiento de distrofias musculares que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de boro o un compuesto de boro a un paciente en necesidad del mismo.

“Cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de un compuesto o un agente terapéuticamente activa que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad u otra condición médica no deseable, sea suficiente para tener un efecto beneficioso con respecto a esa enfermedad o condición. La cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo del tipo del compuesto seleccionado o un agente terapéuticamente activo, la enfermedad o condición y su gravedad, y la edad, el peso, etc. del paciente a ser tratado. Determinar la cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto dado o un agente terapéuticamente activo se encuentra dentro de la práctica habitual del arte y no requiere más que experimentación de rutina.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente patente tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en el arte al que pertenece esta invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente patente pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o pasos. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en el

arte tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Muestra las mediciones del área muscular media de secciones transversales de los músculos indirectos de moscas (IFM) en moscas de control, DM1 y DM1 tratadas con bórax a las concentraciones indicadas. Las moscas con DM1 tratadas con bórax 0,59 mM presentaron una recuperación parcial significativo del área muscular media, lo que significa que la atrofia muscular fue aliviada.

FIG. 2. Muestra resultados del ensayo del vuelo en moscas de control, DM1 y DM1 tratadas con bórax. Las moscas con DM1 tratadas con 0,59 mM de bórax presentó una recuperación de la capacidad de vuelo, lo que significa que la función muscular se recuperó de forma significativa.

FIG. 3. Muestra tasas de supervivencia de moscas de control, DM1 y DM1 tratadas con bórax. Las moscas con DM1 tratadas con 0,59 y 1,47 mM de bórax presentaron un aumento significativo en la tasa de supervivencia tanto de moscas macho o hembra, lo que significa que el bórax aumenta la longevidad de los sujetos DM1.

FIG. 4. Muestra una diferenciación miogénica de células humanas de control y DM1. La formación de miotubos fue mejorada de forma significativa después de la adición de bórax 0,59 mM y 1,47 mM, lo que significa que el bórax restaura la capacidad perdida de las células DM1 para diferenciar del mioblasto al miotubo, tal como se puede ver en las imágenes (FIG 4.1), y los valores de cuantificación obtenidos (FIG. 4.2).

FIG. 5. Muestra una diferenciación miogénica de células humanas de control y DMD. Aunque la formación de miotubos no se logró completamente, las células tratadas con bórax presentaron un aumento relevante en el número de células y la fusión celular como un paso preliminar de miogénesis completa, lo que significa que el bórax aumenta fuertemente la migración celular y la fusión.

35

EJEMPLOS1. Estudio de la atrofia muscular en modelo de mosca con DM1

Se analizó la atrofia muscular en hembras adultas. Los tórax de moscas de siete días de edad se incluyeron en resina Epon y se obtuvieron secciones semi-delgadas (1,5
 5 μm) utilizando un ultramicrotomo. Después de eso, se realizó la tinción del tejido con azul de toluidina. Finalmente, las imágenes se tomaron a un aumento de 100X. Se cuantificó el área muscular generando un mapa binario de una sección fija que contiene los músculos indirectos de vuelo (IFMs, por sus siglas en inglés). A continuación, se cuantificó el porcentaje del área dentro esta sección ocupada por el
 10 tejido. Se observó una recuperación significativa cuando se complementó la comida con bórax a 0,59 mM. Sin embargo, no se observó un efecto significativo tras la adición de 1,47 mM de bórax (ver la Fig. 1). Los gráficos muestran la media \pm d.e. Se analizaron seis individuos por genotipo y se cuantificaron seis fotografías de cada individuo. Todos los valores se compararon con moscas con DM1 (w1118; Mhc-Gal4
 15 UAS-(CTG)480/+) (Modelo de enfermedad descrito en: *Disease Models and Mechanisms* 2013; 6: 184-196). *P<0,05, ***P<0,001.

La adición de bórax restaura parcialmente la atrofia muscular en moscas con DM1, lo que indica que las moscas del modelo DM1 pueden ser tratadas y pueden reparar su
 20 atrofia muscular hasta niveles fisiológicamente saludables.

2. Estudio del ensayo del vuelo en el modelo de mosca con DM1

Se recogieron 120 moscas de un día de vida en tubos que contienen comida estándar
 25 o comida complementada con bórax. Las moscas se alicuotaron en grupos de 30 moscas por tubo. Los tubos se mantuvieron a 25°C durante siete días, cuando se realizó el ensayo de vuelo. En el ensayo, las moscas se dejaron caer a través de un embudo hasta la parte superior de un cilindro de 90 cm de alto. En el interior del cilindro existía una lámina de plástico cubierta con pegamento, de manera que las
 30 moscas fueran inmovilizadas cuando entraran en contacto con la misma. Después de eso, la lámina de plástico se retiró y se tomó una fotografía para su posterior análisis con el Software ImageJ que incluye la medición de la altura de posado de cada individuo. Las moscas que tienen más capacidad responderán a la caída más rápido y se posan en un lugar más alto en las paredes del cilindro. Las moscas con pobres
 35 tiempos de respuesta o aquellas que no son capaces de volar se quedarán pegadas cerca de o en la parte inferior del cilindro. La adición de 0,59 mM de bórax a la comida

de las moscas tuvo como resultado un aumento significativo en la capacidad de vuelo de las moscas analizadas. Sin embargo, la adición de 1,47 mM de bórax no produjo resultados significativos (ver la Fig. 2). El histograma muestra la media \pm e.e.m. ***P<0,001. Se obtuvieron valores P utilizando un ensayo t no pareado bilateral ($\alpha =$
 5 0,05). Todas las comparaciones se denominan condición "DM1".

La adición de bórax produjo una recuperación estadísticamente significativa de la capacidad de vuelo de las moscas con DM1, lo que indica que el bórax está causando no solamente la estructura anatómica correcta del tejido muscular a recuperar, sino
 10 también la funcionalidad de este tejido. Esta afirmación es de gran importancia ya que indica que el tratamiento con bórax no puede únicamente permitir la regeneración muscular a nivel anatómico sino también a un nivel funcional con una infinidad de posibles aplicaciones en el área de la biomedicina.

15 3. Ensayo de supervivencia

Para estudiar el tiempo de supervivencia de las moscas con DM1 tratadas con los compuestos, se recogieron 25 moscas por tubo que contenía la comida complementada y se mantuvieron a 25°C hasta su muerte. Se establecieron cuatro
 20 tubos por compuesto, ya que el experimento se realizó con 50 machos y 50 hembras. Se anotó el número de moscas muertas a diario. Las moscas se cambiaron a tubos que contenían comida fresca (más compuesto) tres veces en semana. Se obtuvieron las curvas de supervivencia utilizando el método de Kaplan–Meier y se compararon a nivel estadístico de acuerdo con el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon ($\alpha=0,05$) y el test
 25 de Mantel-Cox *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. La adición de 0,59 mM y 1,47 mM de bórax a la comida de las moscas tuvo como resultado una supervivencia alargada de las moscas tanto macho como hembras analizadas (Fig. 3).

Otro síntoma característico de la DM1 en el modelo de mosca es su muerte temprana.
 30 Se ha observado que el bórax aumenta la longevidad tanto en machos como en hembras con DM1, lo que indica que la regeneración de la anatomía y la función muscular promovida por el bórax también alarga la esperanza de vida. Esta afirmación es de gran importancia, considerando que los pacientes con distrofias musculares han visto comprometida su esperanza de vida.

35

4. Diferenciación miogénica In vitro de células con DM1 humanas

Se realizó transdiferenciación de fibroblastos cutáneos inmortalizados (hTERT) saludables y con DM1 (2600 repeticiones CTG), en mioblastos (Modelo de enfermedad descrito en: *Disease models and mechanisms* 2017; 10: 487-497). Se sembraron 20,000 células/cm² después de recubrir los diferentes sustratos utilizados con 20 µg/ml de una solución de fibronectina utilizando un medio basal (DMEM con 4,5g de Glucosa, FBS al 10%, P/S 1%). Se utilizó vidrio como sustrato de control y también se incluyeron sustratos recubiertos por “spin coating” (recubrimiento por rotación) como material modelo para someter a ensayo un posible vehículo de administración para el bórax. Las células se dejaron adherir durante 24 h. Después de eso, se indujo la transdiferenciación de fibroblastos en células musculares estimulando la expresión del factor de transcripción MyoD a partir de un vector portador introducido en las células utilizando un medio de diferenciación (DMEM con 4,5g Glucosa, Insulina-Transferrina-Selenio al 1%, P/S 1%, Doxiciclina al 0,02%). La diferenciación miogénica medida en términos de formación de miotubos resultó potenciada de forma significativa tras la adición de bórax 0,59 mM y 1,47 mM. De hecho, el porcentaje de células diferenciadas aumentó de forma monótona a medida que lo hizo el bórax, al contrario que los resultados obtenidos con los experimentos con modelos de mosca con DM1. Las imágenes muestran la formación de miotubos de fibroblastos humanos de DM1 con transdiferenciación después de tinción con marcador muscular actinina α -sarcomérica (ver la Fig. 4,1, panel de imágenes). Las imágenes del microscopio de fluorescencia (canal DAPI - núcleos, y canal Cy3 - miosina sarcomérica) fueron adquiridas a un aumento de 10 x (n = 10), se transformaron en un mapa de bits en escala de grises de 8-bits (software Fiji-ImageJ) y se segmentaron utilizando el plugin Trainable Weka Segmentation para crear una máscara binaria para ambos canales el DAPI y el Cy3. Se contaron los núcleos totales por imagen utilizando el comando de análisis de partículas. A continuación, la imagen segmentada del DAPI se sustrajo de la imagen segmentada del canal Cy3, y el resto de los núcleos se contaron y se asignaron a células no diferenciadas. Se calculó la fracción de células diferenciadas sustrayendo los núcleos no diferenciados de los núcleos totales contados (ver la Fig. 4,2, gráficos).

Los ensayos in vitro realizados en células con DM1 humanas mostraron que el bórax ejerce un efecto positivo sobre la diferenciación miogénica. Estos resultados confirman los obtenidos en el modelo de mosca con DM1. En contraste con los resultados obtenidos en moscas en el que la concentración óptima de bórax era de 0,59 mM, los

resultados indican que en las células humanas la concentración de bórax que ejerce mayores efectos es de 1,47 mM. A partir de esto, sigue que en la aplicación de una posible terapia, la dosis de bórax dependerá del organismo a ser tratado. Después de tratar células de DM1 humanas con bórax, fueron capaces de alcanzar niveles de diferenciación miogénica similares a los de células saludables. Este sorprendente efecto sugiere que el tratamiento con bórax podría estimular la capacidad de la regeneración muscular que está comprometida en las células de pacientes con DM1.

5. Diferenciación miogénica In vitro de células de DMD humanas

10

Se utilizaron células primarias saludables y de DMD de biopsias de pacientes para este experimento. Se sembraron 20,000 células/cm² después de recubrir los diferentes sustratos con 20 µg/ml de una solución de fibronectina utilizando un medio de diferenciación miogénica (DMEM con 4,5g de Glucosa, Insulina-Transferrina-Selenio al 1%, P/S 1%). Se analizó la diferenciación miogénica después de 6 días de cultivo. Para este tipo de cultivo celular, que utiliza células primarias directamente obtenidas de pacientes, ha de tenerse en cuenta que son extremadamente delicadas, habitualmente su crecimiento se ralentiza y su acoplamiento se limita incluso en las células saludables de control. Para su mantenimiento, crecimiento y diferenciación apropiados, se requiere la adición de una variedad de factores de crecimiento y otros complementos esenciales en el medio de cultivo. Se realizó este experimento preliminar en las condiciones más restringidas posibles, para eliminar los efectos proporcionados por los diversos factores de crecimiento y otros complementos en los medios, que podrían distorsionar el efecto esperado ejercido por el bórax. Los resultados mostraron que el alineamiento de mioblastos se vio aumentado significativamente tras la adición de bórax 0,59 mM y 1,47 mM tanto en células de control como en células de DMD, siendo la concentración óptima 1,47 mM, unos resultados en la línea de los obtenidos con células de DM1. Las células sin tratamiento con bórax aparecieron aisladas y sin ningún otro contacto celular. Las células tratadas con bórax, presentaron un alineamiento y contacto celular claro, como un paso previo de la formación de miotubos. En este caso no se pudo analizar la formación de miotubos debido a las restringidas condiciones experimentales, ya que se ha utilizado un medio de cultivo mínimo (DMEM con 4,5 g de Glucosa, Insulina-Transferrina-Selenio al 1%, P/S 1%). Las imágenes muestran la tinción del marcador muscular actinina α -sarcomérica (ver Fig. 5). Se adquirieron las imágenes del microscopio de

35

fluorescencia (canal DAPI - núcleos, y canal Cy3 – miosina sarcomérica) a un aumento de 20 x (n = 10).

5 De forma interesante, los experimentos realizados con células de DMD mostraron que el tratamiento con bórax aceleró la migración y el alineamiento celular, indicativo de un paso previo de la formación de miotubos. Este fenómeno ocurre bajo condiciones restringidas del cultivo celular y no está presente en células saludables.

10 Incluso bajo las condiciones más restringidas, los resultados obtenidos indican que el bórax ejerce un claro efecto en la diferenciación miogénica, no solamente en células de distrofia miotónica de tipo 1, sino también en la distrofia muscular de Duchenne. Este sorprendente descubrimiento tiene implicaciones increíbles, ya que ambos tipos de distrofia tienen un origen etiológico muy diferente. Por esta razón, el alcance de la presente invención puede extenderse a otras distrofias musculares aparte de la DM y
15 la DMD.

REIVINDICACIONES

1. Boro o un compuesto de boro para uso en el tratamiento de distrofias musculares.
- 5 2. Boro o un compuesto de boro para uso según la reivindicación 1 en donde dicho compuesto de boro es bórax.
3. Boro o un compuesto de boro para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde las distrofias musculares se seleccionan de entre
10 distrofia miotónica de tipo 1, distrofia miotónica de tipo 2 o distrofia muscular de Duchenne.
4. Boro o un compuesto de boro para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con otro principio activo.
- 15 5. Composición farmacéutica que comprende boro o un compuesto de boro para uso en el tratamiento de distrofias musculares.
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5 en donde el
20 compuesto de boro es bórax.
7. Composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 en donde las distrofias musculares se seleccionan de entre distrofia miotónica de tipo 1, distrofia miotónica de tipo 2 o distrofia muscular de Duchenne.
- 25 8. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en donde dicha composición farmacéutica contiene otro principio activo.

30

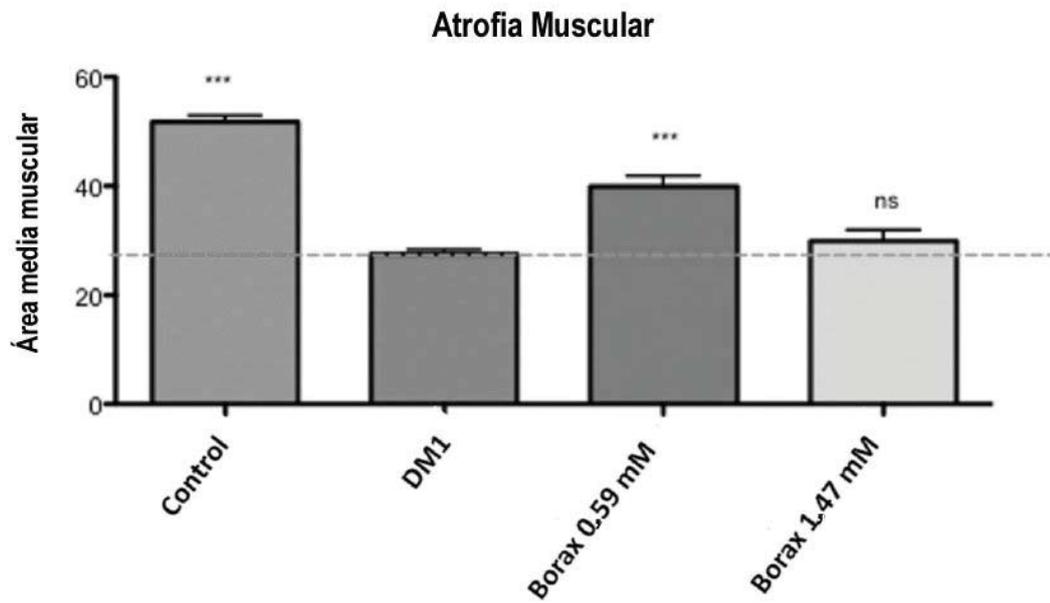


FIG. 1

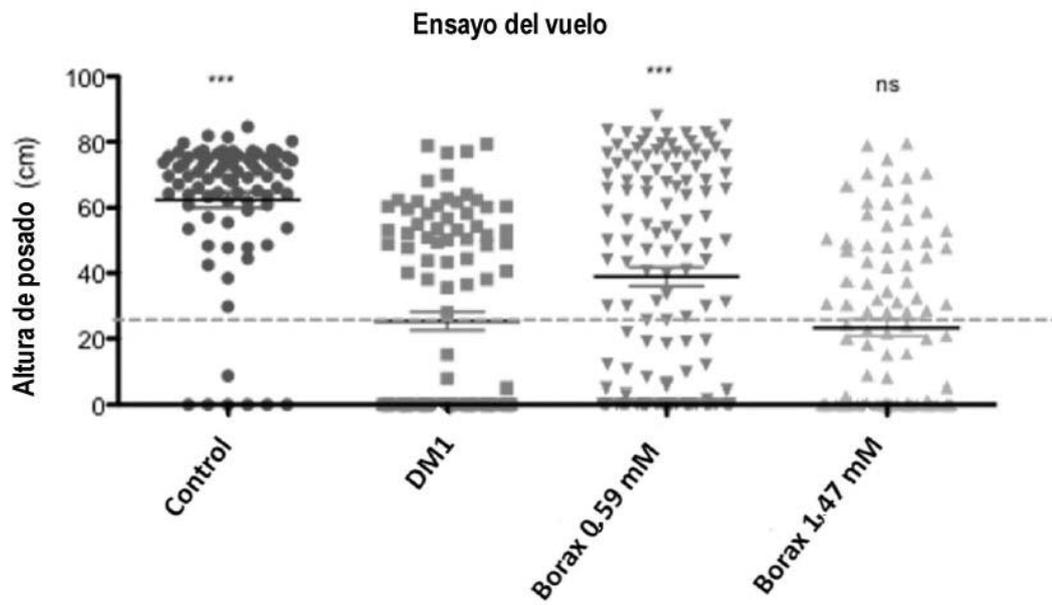


FIG. 2

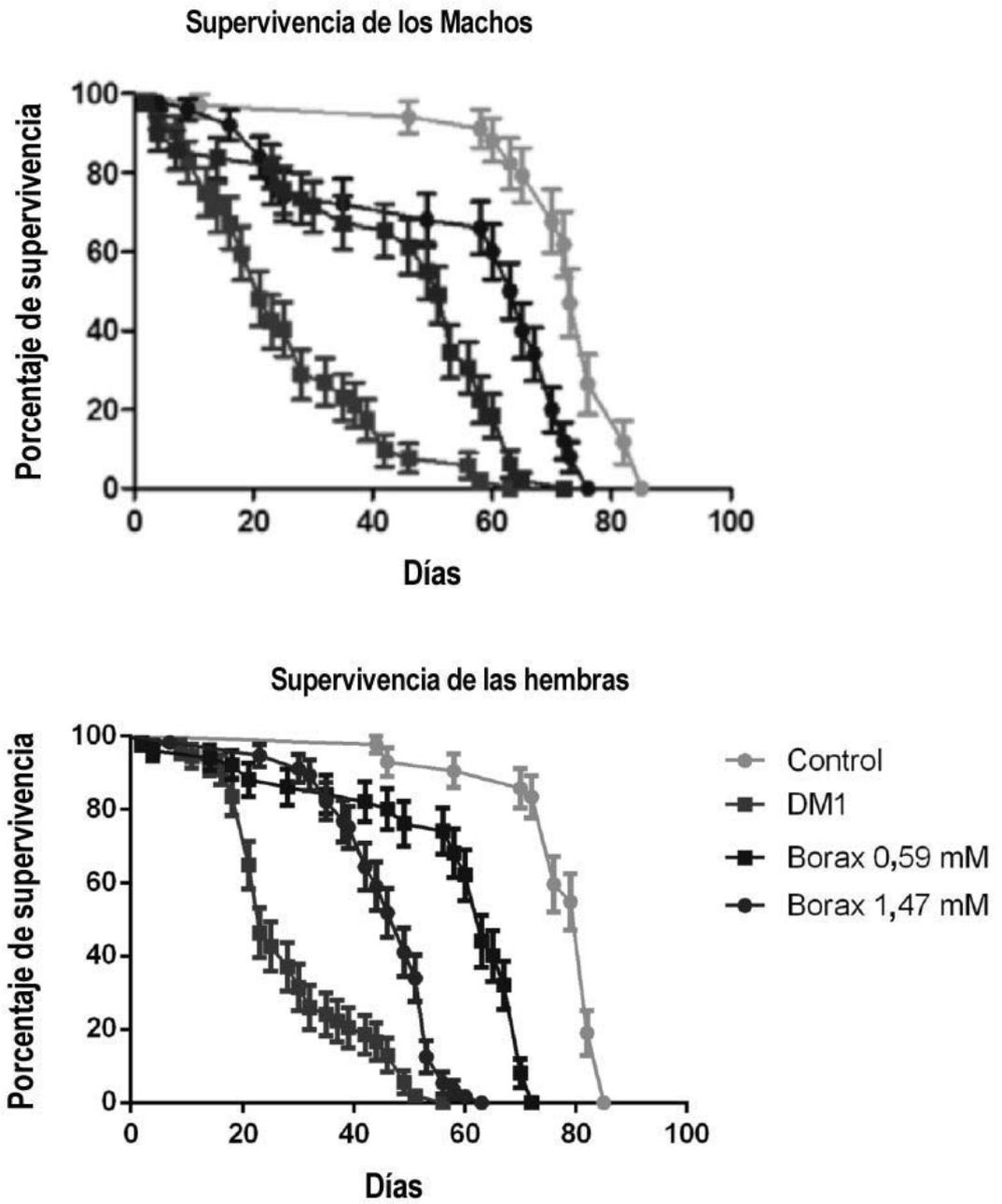


FIG. 3

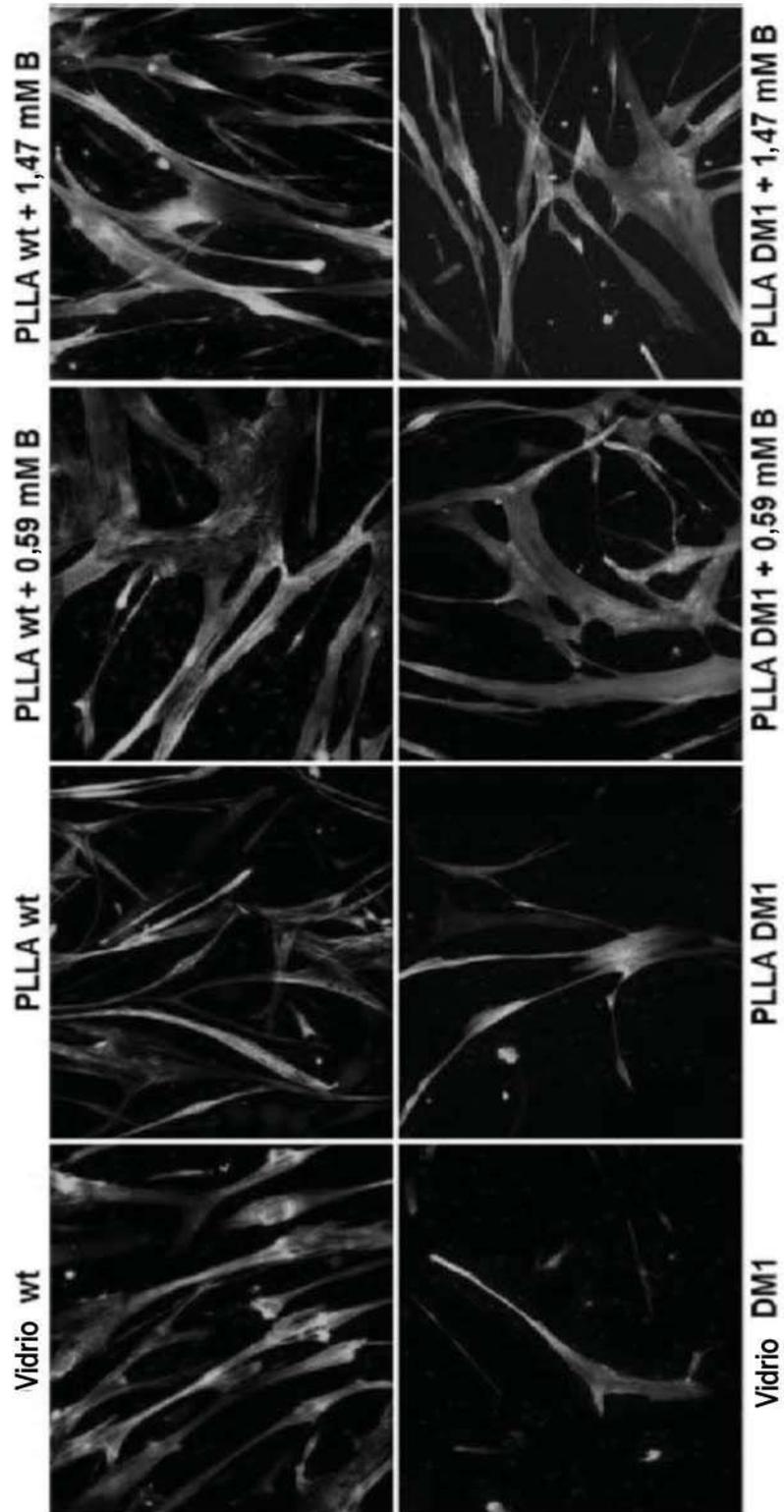


FIG. 4.1

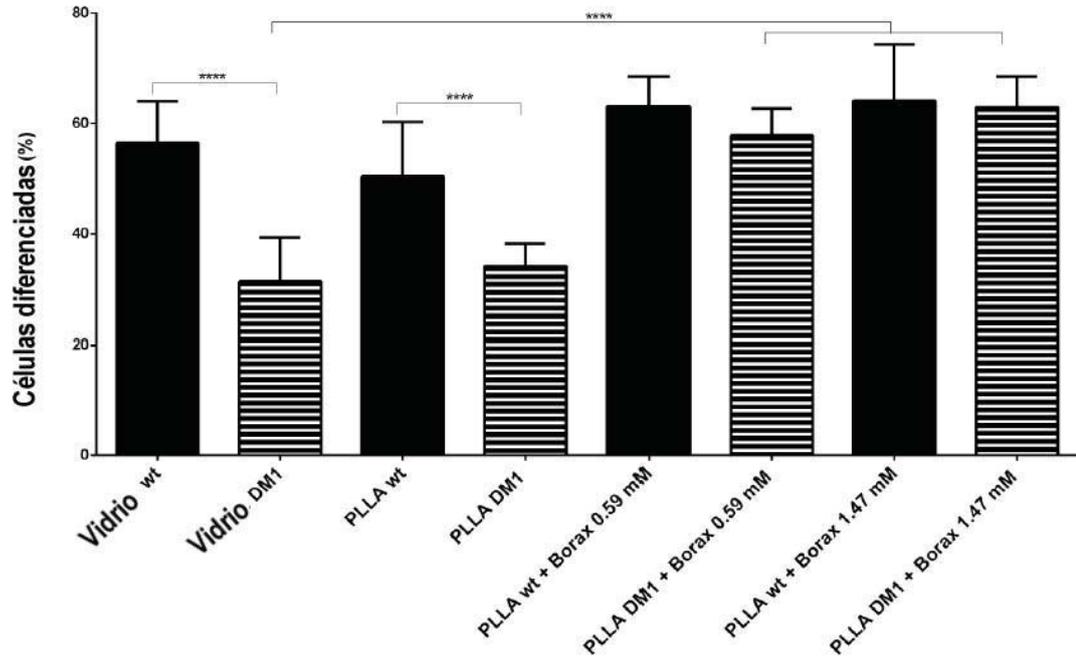


FIG. 4.2

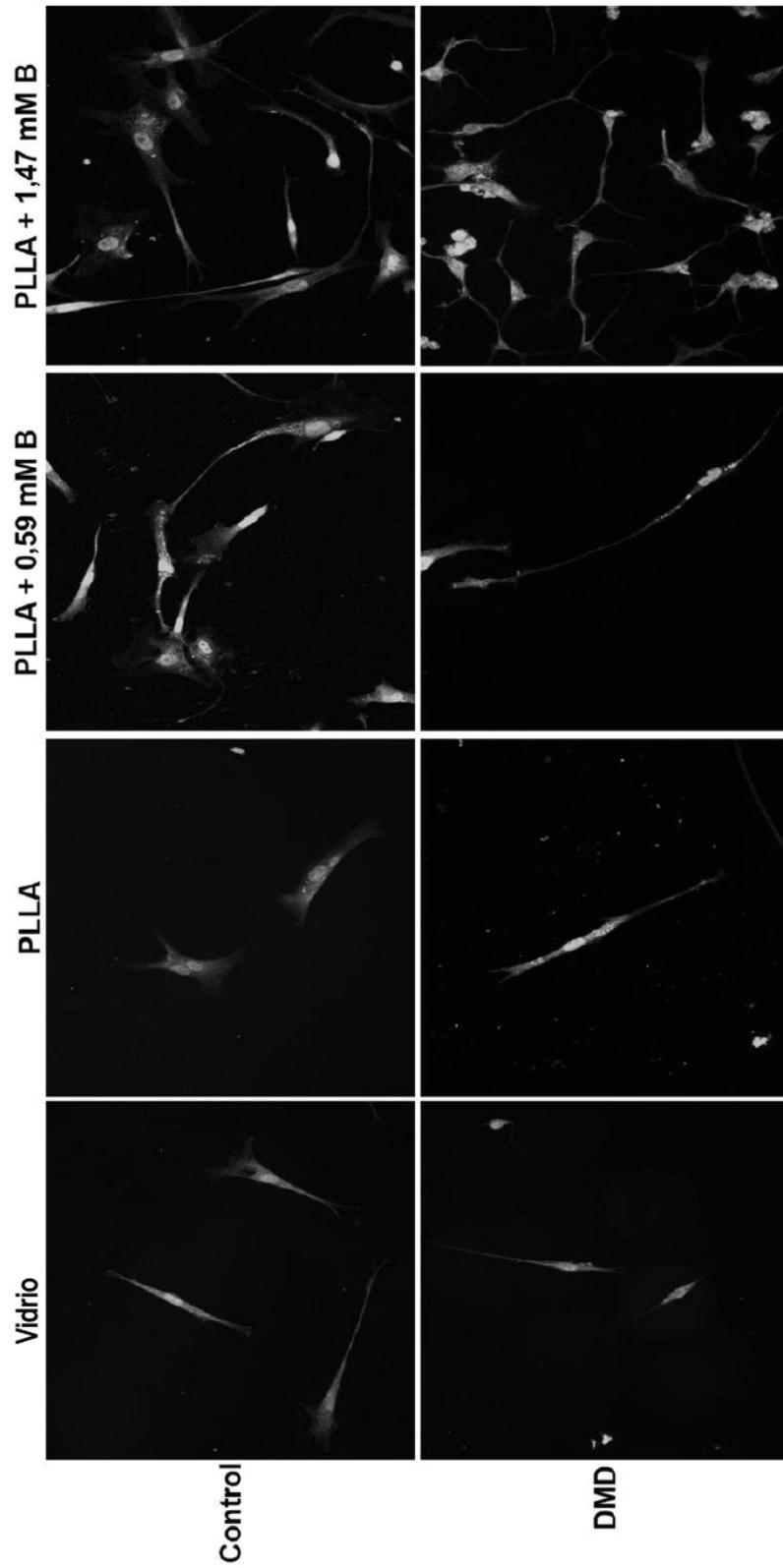


FIG. 5



- ②① N.º solicitud: 201830905
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.09.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K33/22** (2006.01)
A61P21/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D,X	RICO, P. et al. "Borax-loaded PLLA for promotion of myogenic differentiation". TISSUE ENGINEERING: Part A. , 01/11/2015, Vol. 21, páginas 2662-2672, <DOI: 10.1089/ten.tea.2015.0044>; todo el documento.	1-8
D,X	APDIK, H. et al. "Dose-dependent effect of boric acid on myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSCs)". BIOL. TRACE ELEM. RES., 01/06/2015, Vol. 165, Nº 2, páginas 123-130, <DOI: 10.1007/s12011-015-0253-3>; todo el documento.	1-8
D,A	LLAMUSI, B. et al. "Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a Drosophila myotonic dystrophy model". DISEASE MODELS & MECHANISMS, Enero 2013, Vol. 6, Nº 1, páginas 184-196, <DOI: 10.1242/dmm.009563>; todo el documento.	1-8
D,A	ARANDEL, L. et al. "Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds". DISEASE MODELS & MECHANISMS, 01/04/2017, Vol. 10, Nº 4, páginas 487-497, <DOI: 10.1242/dmm.027367>; todo el documento.	1-8
A	SMITH, A.S.T. et al. "Muscular dystrophy in a dish: engineered human skeletal muscle mimetics for disease modeling and drug discovery". DRUG DISCOVERY TODAY, Septiembre 2016, Vol. 21, Nº 9, páginas 1387-1398, <DOI: 10.1016/j.drudis.2016.04.013>; todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.02.2019

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE